

51

Int. Cl.:

A 23 j, 1/14

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

52

Deutsche Kl.:

53 i, 1/07

10

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 2 322 462

Aktenzeichen: P 23 22 462.6

Anmeldetag: 4. Mai 1973

Offenlegungstag: 21. November 1974

Ausstellungspriorität: —

31

Unionspriorität

32

Datum: —

33

Land: —

31

Aktenzeichen: —

54

Bezeichnung:

Verfahren zur Gewinnung von Proteinen

61

Zusatz zu: —

52

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder:

Institut für MilCHForschung der Deutschen Demokratischen Republik,
X 1400 Oranienburg

Vertreter gem. § 16 PatG: —

72

Als Erfinder benannt:

Schwenke, Klaus Dieter, Dr., X 1530 Teltow-Seehof;
Simon, Barbara, Dr., X 1503 Potsdam-Bornstedt

56

Rechercheantrag gemäß § 28 a PatG ist gestellt

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DT-OS 1 667 959

FR-PS 1 546 233

BE-PS 707 302

GB-PS 1 210 926

US-PS 3 607 860

BEST AVAILABLE COPY

1 2 322 462

Anmelder: Institut für MilCHForschung der DDR, 14 Oranienburg,
Sachsenhausener Straße 7

Vertreter: Pat.-Ing. Ernst K i t t n e r, Abteilungsleiter
Neuerer-, Patent- und Lizenzwesen im Institut für
MilCHForschung der DDR, 14 Oranienburg, Sachsenhausener
Straße 7

Verfahren zur Gewinnung von Proteinen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Proteinen, insbesondere von Albuminen und Globulinen aus Samen von Raps, Sonnenblumen und Leguminosen, wobei sowohl eine stufenweise als auch eine kombinierte Gewinnung von Globulinen und Albuminen erreicht werden soll.

Das übliche Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus Pflanzensamen besteht in der isoelektrischen Fällung in saurem Milieu, wobei nur die säurefällbare Globulinfraktion erfaßt wird, während die säurelösliche Albuminfraktion ungefällt in Lösung verbleibt. Zur Gewinnung der säurelöslichen Molkenproteine der Milch wird die Hitzepräzipitation in saurem Milieu angewandt, die entweder für Molkenproteine allein oder durch Kombination mit der isoelektrischen Kaseinfällung für Kasein und Molkenproteine enthaltende Lösungen eingesetzt werden kann. Zur Trennung von Nucleinsäuren und Proteinen aus mikrobieller Biomasse ist eine Fällung der Proteine aus alkalischer Lösung durch Temperatureinwirkung beschrieben worden. Es ist weiterhin die Fällung von Molkenproteinen mit polyanionischen Agentien wie Natriumalginat oder Natriumpolyphosphat bekannt.

Zur Gewinnung der Albumin-Fraktion aus Samen wie Sonnenblume und Raps ist das herkömmliche Hitzepräzipitationsverfahren ungeeignet. Erhitzen der nach der isoelektrischen Globulin-Fällung resultierenden sauren Albuminlösung liefert entweder nur Spuren gefällter Albumine oder überhaupt keine Albumin-Präzipitate. Aus diesem Grunde ist auch das genannte Hitzepräzipitationsverfahren für Milchproteine auf Extrakte von Pflanzenproteinen nicht übertragbar, zumal sich auch pflanzliche Globuline durch relativ große Stabilität außerhalb des isoelektrischen Bereichs auszeichnen und bei Hitzeeinwirkung unter günstigen Konzentrationsbedingungen zwar zur Gelbildung neigen, nicht aber in allen Fällen aus weniger konzentrierten Lösungen, wie sie bei den üblichen Extrak-

tionsverfahren erhältlich sind, koagulieren. Die für die Gewinnung mikrobieller Proteine eingesetzte Hitzebehandlung alkalischer Lösungen führt bei den Proteinen aus Rizinus-Samen zwar zu einer Desaktivierung toxischer Proteine, nicht aber zu einer nennenswerten Ausfällung von Proteinen. Zudem wäre eine Übertragung der für mikrobielle Proteine beschriebenen Verfahrensweise auf pflanzliche Rohstoffe mit dem Ziel der Proteingewinnung deshalb problematisch, weil die in Lösung neben dem Protein vorliegenden Schleimstoffe, Polysaccharide, Phytine und andere Nichtprotein-Komponenten des Samenmaterials durch Koprzipitation mit dem koagulierenden Protein ebenfalls ausfallen und dieses verunreinigen würden. Das für die Gewinnung von Protein-Konzentraten beschriebene Verfahren ist deshalb für die Gewinnung von Protein-Isolaten wenig geeignet. Der Einsatz polyanionischer Agentien zur Proteinfällung liefert Protein-Fällungsmittelkomplexe, deren Gehalt an Fällungsmittel in den meisten Fällen aus lebensmittelrechtlichen Gründen unzulässig ist oder bei der Verarbeitung stört. Zudem ist die Fällung mit polyanionischen Agentien als eine vorzugsweise auf ionische Wechselwirkungen mit dem Protein beruhende Reaktion auf salzfreie oder salzarme Lösungen beschränkt und somit bei stark salzhaltigen Protein-Extrakten nicht anwendbar. Lösungen mit relativ hohem Salzgehalt, z.B. 10 % Kochsalz, sind aber als wirksame Eiweiß-Extraktionsmittel bekannt, die auch Anwendung in einem Verfahren zur kombinierten Öl-Protein-Gewinnung aus Ölsaaten gefunden haben.

Zweck der Erfindung ist sowohl die stufenweise als auch die kombinierte Gewinnung von Albuminen und Globulinen aus salzhaltigen oder salzfreien Extrakten eiweißhaltiger Pflanzenteile durch Abstellung der genannten Mängel des Standes der Technik. Die Notwendigkeit einer Gewinnung der Albuminfraktion besteht insbesondere bei Pflanzensamen mit hohem Albuminanteil; dieser macht z.B. bei Rapssamen 50 % des Proteinanteils aus.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die in Extrakten aus pflanzlichem Material gelöst vorliegenden Proteine, insbesondere Globuline und Albumine ohne Anwendung von Fällungsmitteln, die mit den Proteinen Komplexe oder schwer zu trennende Verbindungen eingehen, in hoher Ausbeute und Reinheit zu gewinnen. Entsprechend

dem Verwendungszweck sollte die Gewinnung sowohl eine kombinierte Fällung der Globuline und Albumine als auch eine getrennte, stufenweise Fällung beider Proteine unter gleichzeitiger Abtrennung von Nichtprotein-komponenten des Samenmaterials ermöglichen. Weiterhin sollte die Proteinfällung weitgehend unabhängig vom Elektrolytgehalt durchführbar und auf Extrakte verschiedener Eiweißquellen übertragbar sein.

Es wurde gefunden, daß die störenden Schleimstoffe, Phytine und Polysaccharide vor der Ausfällung der Proteine dadurch entfernt werden können, daß die bei den üblichen Extraktionsverfahren mit Salzlösungen neutralen bis schwach sauren Protein-Extrakte oder die nach isoelektrischer Fällung der Globuline resultierenden und die Albumine enthaltenden Überstandslösungen bei Temperaturen zwischen 0 und 50 ° C auf pH-Werte zwischen 7 und 9,5, vorzugsweise zwischen 7,0 und 8,5 eingestellt werden. Die unter milden pH- und Temperaturbedingungen (pH 7,0 - 8,0, 20° C) abgeschiedenen Nichtprotein-Stoffe enthalten keine nennenswerten Mengen an Protein-Stickstoff. Hingegen fallen bei höheren pH-Werten, insbesondere über 9,0 und Temperaturen, insbesondere über 80° C, zunehmende Mengen an Protein aus. Zur Gewinnung der Proteine aus der schleimstofffreien Lösung wird das pH zweckmäßig auf Werte zwischen 9,0 und 10,0 und die Temperatur auf Werte zwischen 80 und 100° C eingestellt. Im Gegensatz zu den Proteinen aus mikrobieller Biomasse, die als funktionelle Proteine eine größere Labilität gegenüber denaturierenden Agentien besitzen als die Speicherproteine der Pflanzensamen und bereits im neutralen oder sauren Bereich in guter Ausbeute durch Hitzeeinwirkung gefällt werden können, besitzen pflanzliche Proteine in den bei der Extraktion aus dem Samenmaterial erzielbaren Konzentrationen von 0,5 bis 2,5 (bzw. von 0,2 bis 1,0 % in den Überständen der isoelektrischen Fällung) eine ausgesprochene Temperatur- und pH-Schwelle, unterhalb deren eine Koagulation nicht eintritt. Im angegebenen Temperatur- und pH-Bereich lassen sich Protein-Ausbeuten von über 90 % erzielen. Bei höheren Protein-Konzentrationen (> 10 %) gelingt eine Hitzefällung der Proteine in geringerem Maße bereits bei pH-Werten zwischen 7,0 und 8,0, jedoch lassen sich derartige Konzentrationen durch die üblichen Extraktionsschritte nicht reali-

sieren. Albumine aus den Samen von Raps und Sonnenblume zeichnen sich durch stark basischen Charakter (isoelektrische Punkte über pH 9,0) aus. Ihre Fällbarkeit ist umso besser, je näher der pH-Wert ihrer Lösung im isoelektrischen Bereich liegt. In stärker alkalischen Gebiet geht die Fällbarkeit jedoch zurück. Die gelösten Proteine koagulieren unter den genannten Bedingungen schlagartig, so daß bereits kurzzeitiges Erhitzen von 1 bis 5 min zur Erzielung maximaler Ausbeuten ausreicht. Es wurde weiter gefunden, daß eine gemeinsame Fällung der Globuline und Albumine aus Eiweißextrakten durch Hitze-koagulation aus alkalischer Lösung erfolgen kann. Die Anwesenheit saurer (Globuline) und basischer (Albumine) Proteine in Pflanzenextrakten und ihre Wechselwirkung ermöglichen die Gewinnung beider Fraktionen durch Einwirkung von Hitze unter den Bedingungen der Albuminfällung, obwohl die Globuline allein nicht in allen Fällen durch Hitze koaguliert werden. Dank einem günstigen Albumin-Globulin-Verhältnis in den Samen von Raps und Sonnenblume können hier Ausbeuten von über 90 % des gelösten Proteins erzielt werden.

Wie weiter gefunden wurde, läßt sich die nach Fällung der Proteine verbleibende Überstandslösung wiederholt zur Extraktion von Samenmaterial einsetzen, ohne daß eine Verminderung der durch Hitze-koagulation erzielbaren Proteinausbeute eintritt. Der pH-Wert des hitzegefällten Proteins liegt gewöhnlich zwischen 8,5 und 9,0. Für seine Aufarbeitung und im Hinblick auf die Weiterverarbeitung erweist es sich als zweckmäßig, die alkalische Lösung unmittelbar vor der Separation des Proteins zu neutralisieren.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können Proteine aus entfettetem oder nicht entfettetem Schrot von Olsaaten oder anderen eiweißhaltigen Samen oder Pflanzenteilen, insbesondere aber aus Samen von Raps, Sonnenblume und Leguminosen, in hohen Ausbeuten gewonnen werden. Damit wird ein viel größerer Eiweißanteil als bei den bisher angewandten Verfahren für Ernährungszwecke nutzbar gemacht. Im Zusammenhang mit ökonomischen Überlegungen, wonach pflanzliche Proteine als Primärproteine bei ihrem Einsatz für die menschliche Ernährung durch den Wegfall der Transformationsverluste eindeutige Vorzüge gegenüber tierischem Protein besitzen, ist diese Ausbeuteerhöhung von Bedeutung.

Die Fällung aus alkalischer Lösung führt bei gleichzeitiger Hitzeeinwirkung zu einer Inaktivierung von Enzyminhibitoren, die in der Albuminfraktion von Ölsaaten und Leguminosen enthalten sind und den Einsatz des Proteins für Ernährungszwecke begrenzen. Da die Verweilzeit in der alkalischen Lösung bei günstiger Verfahrensführung nur kurz ist, wird auch der schädigende Einfluß des Mediums gering. Gleichzeitig wird die Wasserlöslichkeit herabgesetzt, so daß eine Neutralisation erfolgen oder eine Reinigung der Proteine von Salzen und anderen niedermolekularen Verunreinigungen bedenkenlos durch Waschen mit Wasser vorgenommen werden kann. Das Protein kann so zusammen mit der Globulinfraktion, z.B. durch Strukturierung, in eine für die Ernährung gewünschte Form gebracht oder in anderer Weise, z.B. in pulverförmiger, gelöster oder hydrolysierte Form, weiterverarbeitet bzw. generell Nährzwecken zugeführt werden. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Proteine frei von Nichtprotein-Substanzen sind, die in anderen Verfahren als Fällungsmittel dienen. Dadurch erübrigt sich die meist problematische und technisch schwer zu realisierende Abtrennung dieser Fällungsmittel. Die hohen Proteinausbeuten aus salzhaltigen Extrakten ermöglichen überdies eine Kombination des Verfahrens mit der in einer früheren Patentanmeldung vorgeschlagenen Lösungsmittelfreien Ölgewinnung aus Ölsaaten, was erhebliche ökonomische Vorteile mit sich bringt. Die Kopräzipitation von Albuminen und Globulinen bringt nicht nur verfahrenstechnische Vorteile gegenüber einem Mehrstufenprozeß, sie liefert auch ein hochprozentiges Feuchtprotein, dessen Konsistenz - z.B. durch Zugabe von Salzen, - noch verbessert werden kann. Darüber hinaus ist sie für die Herstellung von gemischten Proteinisolaten aus unterschiedlichen Rohstoffen von besonderem Interesse. Die Erfindung ermöglicht weiterhin eine Rückführung des Lösungsmittels in den Extraktionsprozeß und eine Verwertung der Nebenprodukte und Rückstände für Futterzwecke oder als Zusatz für mikrobielle Nährböden. Sie zeichnet sich gegenüber anderen Verfahren zur Albumingewinnung durch technische Einfachheit und wegen des Wegfalls besonderer Eiweißfällungsmittel und deren Abtrennung vom gefällten Protein durch geringen Kostenaufwand aus.

Die Erfindung soll an nachstehenden Beispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Zur Extraktion von Rapssaat werden 200 g Samenmaterial in Gegenwart von 1,6 l 10%iger Kochsalzlösung mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert. Zentrifugation des erhaltenen Homogenats ergibt drei Phasen, eine feste, ungelöste Zellbestandteile enthaltende Rückstandsphase, eine mittlere wäßrige, das extrahierte Protein enthaltende Phase und eine fetthaltige obere Sahneschicht. Nach Dekantation und Filtration werden 1260 ml wäßriger Proteinextrakt mit 39 % des Saatstickstoffs erhalten, der durch Zugabe von 1 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,0 gebracht wird. Nach Abzentrifugieren wird ein 10%iger Proteinschlamm isoliert, der insgesamt 6,7 g Rapsglobulin enthält. Das entspricht einer Ausbeute von 40 % des aus der Saat extrahierten Stickstoffes bzw. 50 % des extrahierten Proteins oder 15,6 % des Gesamt-Stickstoffanteils der Saat. Der nach Abtrennung der Globulinfraktion erhaltene Überstand wird mit 1 N Natronlauge auf einen pH-Wert von 9,5 gebracht, die präzipitierenden Schleimstoffe abzentrifugiert und die Lösung 10 min auf 90 - 95° C erhitzt, wobei die Albuminfraktion ausfällt. Der nach der Zentrifugation gewonnene Proteinschlamm entspricht einer Albumin-Menge von 4,8 g oder 29 % des Extraktstickstoffes bzw. 36 % des im Extrakt enthaltenen Proteins.

Beispiel 2

Zur Extraktion von Sonnenblumensaat werden 160 g geschältes, vorzerkleinertes Samenmaterial in Gegenwart von 1280 ml 10 %iger Kochsalzlösung homogenisiert. Nach Trennung der drei Phasen wie im Beispiel 1 beschrieben werden 1000 ml Extrakt mit einem Eiweißgehalt von 11,1 g erhalten. Durch pH-Einstellung auf 3,0 mit 1 N Salzsäure werden 9,1 g Protein (82 %), gefällt, Hitzebehandlung des auf pH 9,5 eingestellten und von den ausgefallenen Nichtproteinstoffen abgetrennten Überstandes ergibt weitere 1,1 g Protein (11,2 % des Gesamtproteins oder 54 % des Albumins) .

Beispiel 3

Zur Extraktion der Proteine aus Ackerbohnen-Samen (*vicia faba*) werden 100 g geschälte (oder ungeschälte) Samen in einer Schlagmühle zu Mehl vermahlen und in 800 ml 10%iger Kochsalzlösung mit Hilfe eines Homogenisators intensiv verteilt. Aus den nach Zentrifugation gewonnenen 680 ml Extrakt werden durch Einstellung

des pH-Wertes auf 3,0 13,8 g Eiweiß (68 % des extrahierten Stickstoffes) gefällt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird auf einen pH-Wert von 9,0 gebracht, der entstehende Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand 10 min auf 90° C erhitzt, wobei weitere 1,2 g Eiweiß (5,8 % des extrahierten Stickstoffes) gefällt werden.

Beispiel 4

1200 ml, nach Beispiel 1 gewonnener Rapssaat-Extrakt werden mit 1 N Natronlauge auf pH 7,5 eingestellt, vom Niederschlag abgetrennt und auf pH 9,5 gebracht. Anschließend wird 10 min auf 90 bis 95° C erhitzt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Der so gewonnene Proteinschlamm enthält 11,5 g Albumin-Globulin-Gemisch (86 % des extrahierten Proteins).

Beispiel 5

Zur Extraktion von Sonnenblumensaat werden 160 g geschältes, vorzerkleinertes Samenmaterial in Gegenwart von 1280 ml 10%iger Kochsalzlösung homogenisiert. Nach Trennung der drei Phasen wie im Beispiel 1 beschrieben, werden 1000 ml Extrakt mit einem Eiweißgehalt von 11,1 g erhalten. Durch Zugabe von 24 ml 1 N Natronlauge wird der pH-Wert auf 8,5 gebracht, wobei sich Mineral- und Schleimstoffe abscheiden. 10 min Erhitzen des nach Zentrifugation erhaltenen Überstandes auf 85 bis 95° C ergibt 9,3 g Eiweiß (83,8 %) .

Patentansprüche:

- ① Verfahren zur Gewinnung von Proteinen, insbesondere von Albuminen und Globulinen aus Samen von Raps, Sonnenblumen und Leguminosen, dadurch gekennzeichnet, daß die nach isoelektrischer Fällung der Globuline resultierende Überstandslösung auf pH-Werte gleich oder größer als 7,0 eingestellt wird, die präzipitierenden Stoffe abgetrennt und die Albumine durch Erhitzen auf Temperaturen von 80 bis 100°C, bei pH-Werten über 7,0, vorzugsweise zwischen 9,0 und 10,0, gefällt und gewonnen werden.
2. Verfahren zur kombinierten Gewinnung von Globulinen und Albuminen, insbesondere aus Samen von Raps, Sonnenblumen und Leguminosen, dadurch gekennzeichnet, daß die Globuline und Albumine enthaltende Lösung auf pH-Werte gleich oder größer als 7,0 eingestellt, von den präzipitierenden Stoffen befreit und die Proteine bei pH-Werten über 7,0, vorzugsweise zwischen 9,0 und 10,0, durch Erhitzen auf 80 bis 100° C gewonnen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der nach der Abtrennung der Albumine und Globuline resultierende Überstand nach Einstellen auf einen geeigneten Salzgehalt und pH-Wert wieder zur Extraktion des Samenmaterials verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die, das in alkalischem Milieu gefällte Protein enthaltende Flüssigkeit, vor der Abtrennung auf pH-Werte unter 9,0 eingestellt wird.

Bericht über Veröffentlichungen zum Stand der Technik

A.K. Smith, A.M. Nash, A.C. Eldridge u. W.J. Wolf

Recovery of Soybean Whey Protein with Edible Gums and Detergents
AGRIC. FOOD CHEMISTRY, 10 (1962) 4, 302 - 304

Anonym

MILCHWISSENSCHAFT, 23 (1968), 10 , 656

G. Hedenskog u. L. Ebbinghaus

Reduction of the Nucleic Acid Content of Single-Protein
Concentrates

BIOTECHNOL. AND BIOENGINEERING, 14 (1972) , 447 - 457

USA 2,547,980

USA 3,069,327

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.